

## A ESTRUTURA INTRARETICULOCITÁRIA

A. BRUNNER, JR.

*Serviço de Microscopia Eletrônica do Lab. de Virus e Virusterapia*

### INTRODUÇÃO

As hemácias jovens ou reticulocitos têm sido submetidas a estudos comparativos das estruturas observadas ao microscópio óptico, após coloração supravital, com as verificadas ao microscópio eletrônico.

As diferentes técnicas de preparo de reticulocitos para a observação ao microscópio eletrônico resultam no aparecimento de diferenças significativas na micro-estrutura dos componentes intrareticulocitários, o que levou alguns autores a interpretações discordantes.

Bernhard, Braunsteiner e Mangini (1) e Braunsteiner e Bernhard (2), após hemolisar glóbulos vermelhos em suspensão em água destilada, constataram nos reticulocitos, grânulos dispersos e formas circulares isoladas ou irregularmente agrupadas no interior do estroma, mas não encontraram filamentos semelhantes aos observados ao microscópio óptico após coloração supravital pelo verde Janus B ou azul cresil brilhante. As formas circulares, segundo os autores referidos, seriam pré-existentes e podriam agregar-se em disposição linear sob a ação dos corantes para dar origem ao aspecto de longos filamentos ou seriam, pelo contrário, resultado da desintegração de filamentos devido ao desequilíbrio osmótico provocado.

Bessis (3), Hug, Lippert e Moser (4), Peter e Wigand (5), Jung (6), Wolpers (7) e Brunner e Vallejo-Freire (8), confirmaram a presença de estruturas idênticas em reticulocitos hemolisados em suspensão em água destilada. Alguns autores consideram as formas circulares como componentes normais dos reticulocitos (2,7); outros consideram aquelas estruturas como artefatos provocados pela hemólise (4,8).

Filamentos característicos são observados nos reticulocitos, quando hemolisados em esfregão após secagem parcial; nestas preparações não se observam formas circulares. Estruturas intermediárias entre as circulares e as filamentosas podem ser obtidas desde que se proceda à hemólise em meio de hipotonicidade menor (8).

Em reticulocitos íntegros, Brunner, Vallejo-Freire e Souza Santos (8) verificaram que os filamentos vistos ao microscópio eletrônico e os observados após coloração com verde Janus *B* constituem uma mesma estrutura e as diferenças de aspecto seriam apenas conseqüência da presença do corante. Provaram ainda por meio de cortes ultrafinos, que êsses filamentos correspondem à mitocôndrias, concluindo ser a "Substantia grânulo-filamentosa" essencialmente de natureza mitocondrial. As mesmas conclusões chegaram, independentemente, Braunsteiner, Fellingner e Pakesh (10).

Vallejo-Freire e Brunner (11) encontraram maior evidência de identidade entre filamentos e mitocôndrias no sangue periférico de animais intoxicados com chumbo. As formas circulares resultariam das mitocôndrias filamentosas ou granulares, quando os reticulocitos são submetidos à hemólise em suspensão em água destilada (8 e 10).

Seno (12), Yoshizawa, Nakamoto e Kanda (13) afirmam que o verde Janus *B* e outros corantes supravitais não possuem afinidade para mitocôndrias de reticulocitos; a formação da "Substantia grânulo-filamentosa" seria devida apenas à precipitação de RNA e retículo endoplasmático, provocada pelo corante.

Nêste trabalho apresentamos resultados obtidos com reticulocitos por meio de cortes ultrafinos, aplicando a técnica usada por Seno (12) para a observação de células coradas supravitalmente.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Para facilitar a observação ao microscópio eletrônico, uma reticulocitose de cerca de 20% foi provocada em cobaias de 350 a 400 g, após sangrias cardíacas de 5 a 6 ml durante 6 dias.

Os reticulocitos foram corados com verde Janus *B*, adicionando-se 2 ou 3 gotas de sangue em 3 a 4 ml de solução salina isotônica, contendo o corante nas concentrações de 1/10.000, 1/20.000, 1/50.000 e 1/100.000. Decorridos 5 a 10 minutos e confirmada a coloração ao microscópio com a concentração a 1/10.000, a suspensão de glóbulos vermelhos foi centrifugada a 500 r.p.m. e ao sedimento adicionou-se solução de ácido ósmico a 1% em tampão veronal-acetato de pH 7.4. Para fixar o corante e aumentar o contraste, aplicamos a técnica usada por Seno (12), tratando a suspensão de glóbulos vermelhos, 5 minutos após fixação pelo ácido ósmico, com igual volume de solução aquosa de  $H_2Cl_2$ , 3% e KI, 5,6%.

As hemácias, após 25 minutos, foram lavadas em água destilada e submetidas à desidratação rápida na série alcoólica, 5 minutos em cada álcool.

A inclusão foi preparada numa mistura de metil e butil-metacrilatos na proporção de 1:4, contendo 2% de peróxido de diclorobenzoila e 0,01% de nitrato de uranila. A polimerização se processou a 45°C, durante 12 a 24 horas. As

trocas dos meios, nos quais as hemácias eram mantidas, foram feitas após centrifugações e decantações sucessivas; a desidratação se processou rapidamente, porque o complexo verde Janus B — fixador é solúvel nos alcóois. Os controles, mantidos em salina isotônica sem corante, foram tratados de modo idêntico.

Parte dos glóbulos, após a coloração supravital, foi utilizada no preparo de esfregaços em lâminas cobertas previamente com filme de colódio, para proceder à hemólise após secagem parcial, segundo a técnica de Brunner e Vallejo-Freire (8).

Os cortes foram obtidos num micrótomo Porter Blum e as preparações examinadas num microscópio Siemens ÛM 100b, a 60 Kv, com aumentos de X 7200 e X 15000.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Reticulócitos corados pelo verde Janus B apresentam mitocôndrias densas aos eletrons devido ao acúmulo do complexo corante-fixador no sistema de membranas. Observam-se várias secções transversais de retículo endoplasmático, algumas próximas às mitocôndrias (fig. 1).

Nos controles (fig. 2), as mitocôndrias se apresentam com o sistema de membranas mais delgadas e menos densas; não há material suficientemente corado para dispersar os eletrons.

Parte dos reticulócitos corados, hemolisa total ou parcialmente. Nas figuras 3 e 4 observam-se reticulócitos hemolisados, cujas mitocôndrias mostram claramente um aumento de densidade aos eletrons. Esta observação sugere a presença de corante junto às membranas, que se apresentam com maior espessura, em relação aos controles. Mais ou menos periodicamente e em disposição perpendicular ao comprimento das mitocôndrias observam-se faixas menos densas correspondentes ao espaço intratrabecular. O espaço intertrabecular apresenta-se também mais denso na figura 4. Junto às mitocôndrias observam-se secções de retículo endoplasmático e partículas aglomeradas independentemente, que poderiam ser de ribonucleoproteínas, dada a densidade e dimensões (100 — 150 Å) com que se apresentam (14).

A participação do retículo endoplasmático na formação da "Substantia grânulo-filamentosa" é mais clara nas preparações de reticulócitos hemolisados em esfregaço, após coloração supravital e secagem parcial. O reticulócito da figura 5 foi corado com verde Janus B na concentração de 1/10 000. Não se observa retículo endoplasmático independente do aglomerado de mitocôndrias com o corante, o que ocorre com reticulócitos corados com verde Janus B até uma concentração de 1/100.000; na figura 6, um reticulócito preparado pela mesma técnica, porém tratado com o corante a uma concentração de 1/300 000, mostra o retículo endoplasmático distinto em relação às mitocôndrias, como se apre-

sentam os reticulocitos não corados. A aglomeração do retículo endoplasmático dependeria da concentração do corante. Seno, Yoshizawa, Nakamoto e Kanda (13) apresentam figuras de reticulocitos corados pelo sulfato azul de Nilo, nos quais o retículo endoplasmático não se aglomerou às mitocôndrias. As interpretações feitas por aqueles autores diferem das aqui apresentadas. A visualização das estruturas intrareticulocitárias ao microscópio óptico seria função da concentração do corante, como foi demonstrado por Kosenow (15) em preparações coradas supravitalmente pelo acridinorange.

Hogeboom, Claude e Hotchkiss (16), Schneider (7) e Schneider e Hogeboom (18) mostraram que o sistema citocromoxidase se localiza nas mitocôndrias das células hepáticas. Este sistema foi identificado também na fração mitocondrial de reticulocitos, por Rubinstein, Ottolenghi e Denstedt (19) em estudos da atividade enzimática das frações obtidas após hemólise por congelamento e descongelamento de sangue de coelhos. Lazarow e Cooperstein (20) e Cooperstein e Lazarow (21) sugerem a participação do sistema citocromoxidase no mecanismo de coloração das mitocôndrias pelo verde Janus B. Este sistema enzimático seria responsável pela especificidade da coloração. As observações morfológicas aqui feitas estão em concordância com estes achados. O precipitado de corante e ribonucleoproteínas evidenciado por Dustin (22), Thoma (23) e Burt, Murray e Rossiter (24), provavelmente foi dissolvido, em parte, na série alcoólica durante a desidratação.

A estrutura densa aos eletrons apresentada por Seno, Yoshizawa, Nakamoto e Kanda (13) na figura 12, corresponde provavelmente a mitocôndrias, não permitindo distinguir alguma organização interna devido ao excesso de corante utilizado.

Sendo a mitocôndria o elemento estrutural predominante no reticulocito, pode-se considerá-la como o principal componente da "Substantia grânulo-filamentosa" nas preparações coradas supravitalmente para exame ao microscópio óptico. A "Substantia grânulo-filamentosa" seria em parte um artefato, apenas no que se refere à precipitação de ribonucleoproteínas pelo corante, pois o precipitado se dispõe em torno das mitocôndrias evidenciando uma estrutura real, préexistente, na hemácia jovem. Nas preparações em que os reticulocitos não são corados, mas apenas hemolisados após uma secagem parcial, o conceito de "Substantia grânulo-filamentosa" restringe-se às mitocôndrias somente.

Uma continuidade do retículo endoplasmático com o estroma foi verificada (fig. 7). O reticulocito apresentaria poros, de 180 Å de diâmetro, em sua superfície, mantendo comunicação do meio exterior com o citoplasma, temporariamente, podendo-se conjecturar que a penetração do corante se dê por essa via. Maior dificuldade é encontrada para a explicação da passagem do corante através da membrana externa da mitocôndria, que se comportaria como uma membrana semipermeável, desde que se admita sua continuidade em toda a superfície do organelo.

RESUMO

Reticulócitos, corados pelo verde Janus *B* e tratados com um fixador para o corante contendo elementos de número atômico elevado, foram examinados ao microscópio eletrônico em cortes ultrafinos ou após hemólise em esfregaço. Foi possível observar espessamento e aumento de densidade aos eletrons, do sistema de membranas das mitocôndrias.

Concentrações entre 1/10.000 e 1/100.000 do corante provocam aglomeração do retículo endoplasmático, e, provavelmente, ribonucleoproteínas e corante em tôrno das mitocôndrias. Este fato não se verifica quando são utilizadas soluções de verde Janus *B* de menores concentrações. Com estas observações apresenta-se mais uma evidência sôbre a natureza essencialmente mitocondrial da chamada "Substantia grânulo-filamentosa" das hemácias jovens.

SUMMARY

Janus green *B* stained reticulocytes treated with dye fixative containing elements of high atomic number were examined under the electron microscope in ultra thin sections or in smears after hemolysis.

A thickening and an increase of electron density of the mitochondrial membranes system were observed.

At dye concentrations between 1/10.000 and 1/100.000 an agglomeration of the endoplasmic reticulum was seen and, possibly, ribonucleoprotein and dye around the mitochondriae.

This did not occur when solution of Janus green *B* of lower concentrations were used.

These observations give one more evidence as to the essentially mitochondrial nature of the so-called "Substantia granulo-filamentosa" of the young red blood cells.

Agradecemos a assistência técnica prestada pelo sr. José Reis July.

REFERÊNCIAS

1. Bernhard, W., Branusteiner, H. et Mangini, H. — C. R. Soc. Biol. Paris, 143:1513, 1949.
2. Braunsteiner, H. and Bernahrd, W. — Acta Haemat., 3:167-70, 1950.
3. Bessis, M. — Blood, 5:1083-1098, 1950.
4. Hug, O., Lippert, W. and Moser, P. — Citado por Lowenstein, L. M. no International Review of Cytology, VIII, 1959, pág. 142.
5. Peters, D. und Wigand, R. — Klin. Wochschr., 28:649-653, 1950.
6. Jung, F. — Folia Haematol., 74:258-259, 1956.

7. Wolpers, C. — *Klin Wochschr.*, 34:61-69, 1956.
8. Brunner, Jr. A. and Vallejo-Freire, A. — *Exptl. Cell Res.*, 10:55-62, 1956.
9. Brunner, Jr. A., Vallejo-Freire, A. and Souza Santos, P. — *Experientia*, 12:255, 1956.
10. Braunsteiner, H., Fellingner, K. und Pakesch, F. — *Acta Haematol.*, 16:322-323, 1956.
11. Vallejo-Freire, A. e Brunner, Jr. A. — *Mcm. Inst. Butantan*, 24:245-466, 1957/58.
12. Seno, S. — *Acta Path. Japon*, 7:741-759, 1957.
13. Seno, S., Yoshizawa, K., Nakamoto, T. and Kanda, S. — *Folia Haematol.*, 2:269-272, 1958.
14. Palade, G. E. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1:59-68, 1955.
15. Kosenow, W. — *Acta Haematol.*, 7:360-368, 1952.
16. Hogeboom, G. H., Claude, A. and Hotchkiss, R. D. — *J. Biol. Chem.*, 165:615-629, 1946.
17. Schneider, W. C. — *J. Biol. Chem.*, 165:585-593, 1946.
18. Schneider, W. C. and Hogeboom, G. H. — *J. Natl. Cancer Inst.*, 10:969-975, 1950.
19. Rubinstein, D., Ottolenghi, P. and Densted, O. F. — *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 34:222-235, 1956.
20. Lazarow, A. and Cooperstein, S. J. — *Exptl. Cell Res.*, 5:56-69, 1953.
21. Cooperstein, S. J. and Lazarow, A. — *Exptl. Cell Res.*, 5:82-97, 1953.
22. Dustin, Jr. P. — *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 1:144, 1947.
23. Thoma, K. — *Klin. Wochschr.*, 28:215-216, 1950.
24. Burt, N. S., Murray, R. G. E. and Rossiter, R. J. — *Blood*, 6:906-915, 1951.



Fig. 1 — Corte de reticulocito corado supravitalmente com verde Janus B (concentração 1/10.000).  
m — mitocôndria; re — retículo endoplasmático; e — estroma.

Fig. 1 — Section of reticulocyte supravitally stained with Janus green B (concentration: 1/10.000).  
m — mitochondria; re — endoplasmic reticulum; e — stroma.

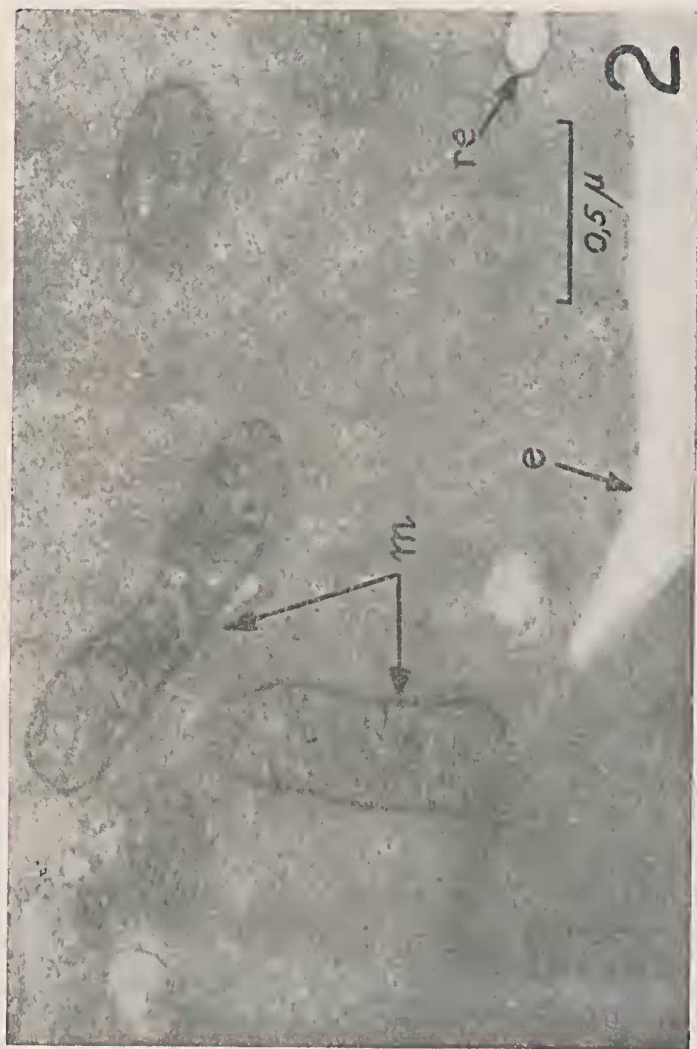


FIG. 2. — Corte de reticulocito. Contrôle, mantido em salina isotônica sem corante. *m* — mitocôndria; *re* — retículo endoplasmático; *e* — estroma.

FIG. 2. — Section of reticulocyte. Control maintained in isotonic saline without dye. *m* — mitochondria; *re* — endoplasmic reticulum; *e* — stroma.



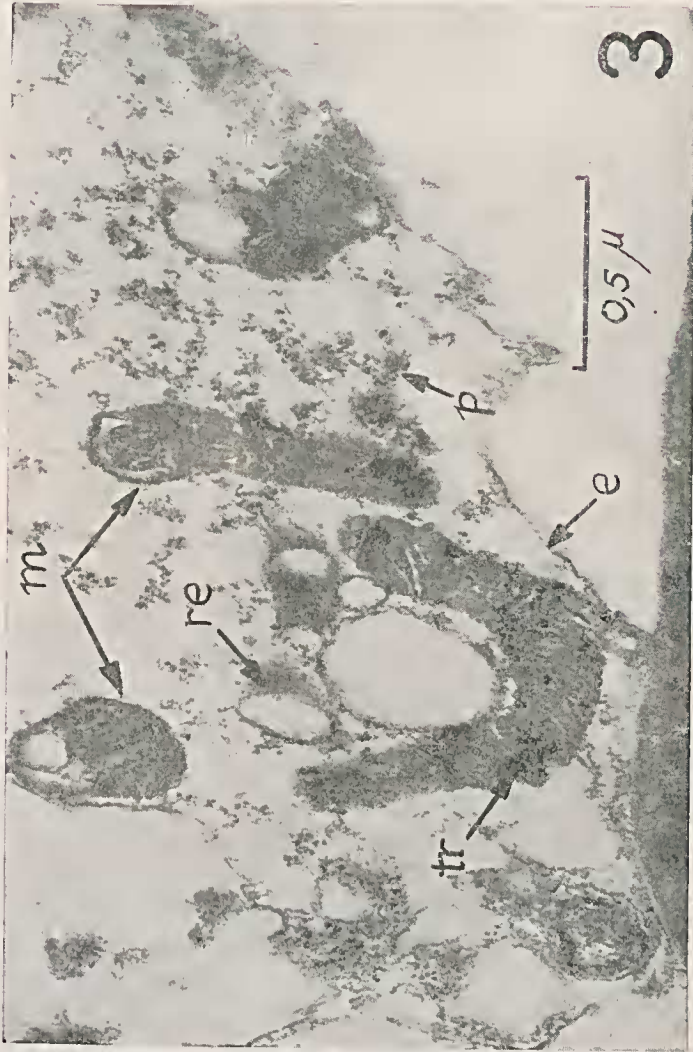


Fig. 3 — Corte de reticulocito hemolisado durante a coloração supravital com verde Janus B (concentração: 1/10.000). *m* — mitocôndrias; *tr* — trabéculas densas e espessadas; *re* — retículo endoplasmático de diâmetro aumentado, cortado transversalmente; *e* — estroma; *p* — partículas densas.

Fig. 3 — Section of reticulocyte hemolysed during supravital staining with Janus green B (concentration: 1/10.000). *m* — mitochondria; *tr* — thick and dense trabeculae; *re* — transversally sectioned endoplasmic reticulum with enlarged diameter; *e* — stroma.

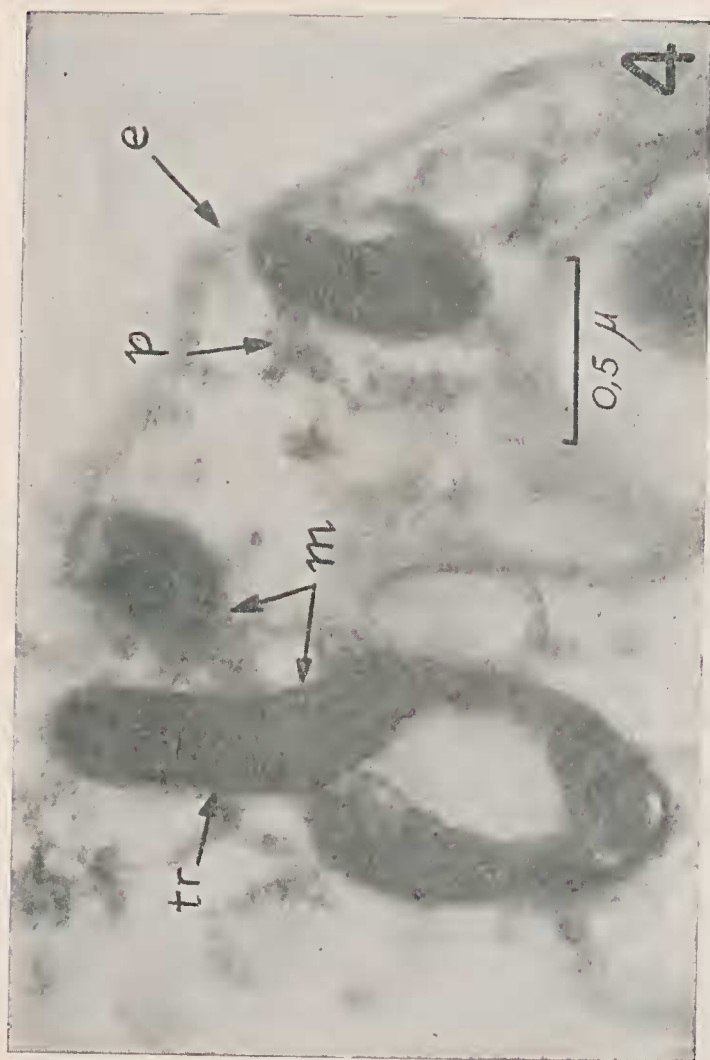


Fig. 4 — Corte de reticulocito corado supravitalmente com verde Janus *B* (concentração: 1/20.000), hemolisado durante a coloração. Mitocôndrias *m* com numerosas trabéculas *tr* densas e espessadas; *p* — aglomerado de partículas densas junto a uma mitocôndria; *e* — estroma.

Fig. 4 — Section of reticulocyte supravitally stained with Janus green *B* (concentration: 1/20.000), hemolysed during staining. Mitochondria *m* with numerous thick and dense trabeculae; p-agglomeration of dense particles near a mitochondria; *e* — stroma.



Fig. 6 — Hemólise em esfregaço após coloração supravital com verde Janus B (concentração: 1/300.000) e secagem parcial. Observa-se o retículo endoplasmático *re* distribuído no estroma, independentemente das mitocôndrias *m*.



Fig. 5 — Hemólise em esfregaço após coloração supravital com verde Janus B (concentração: 1/10.000) e secagem parcial. Não se observa retículo endoplasmático livre, mas apenas um aglomerado denso constituído por mitocôndrias, retículo endoplasmático, corante e provavelmente ribonucleoproteínas.

Fig. 5 — Smear preparation of blood stained supravitaly with Janus green B (concentration: 1/10.000), hemolysed after partial drying. Independent endoplasmic reticulum is not visible. A dense agglomeration of mitochondria, endoplasmic reticulum dye, and probably ribonucleoprotein is seen.

Fig. 6 — Smear preparation of blood stained supravitaly with Janus green B (concentration: 1/300.000), hemolysed after partial drying. In this case there is no agglomeration of the endoplasmic reticulum *re* which is independent from the mitochondria *m*.

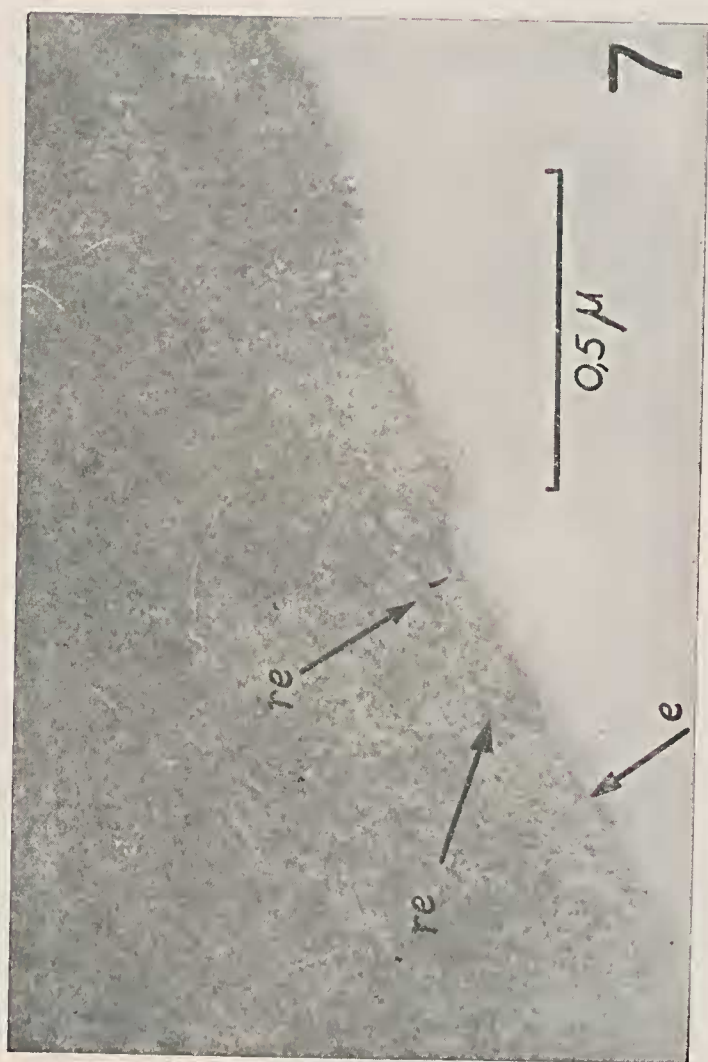


Fig. 7. — Corte de reticulocito, mostrando uma descontinuidade do estroma *e*, de 180 a 240 Å, no ponto em que o retículo endoplasmático *re* se abre para o exterior.

Fig. 7 — Section of reticulocyte showing a discontinuity of the stroma membrane (about 180 — 240 Å) at the site the endoplasmic reticulum opens to the exterior.